

3次元蛍光分析法とPARAFAC解析を用いた 水中残留油分分析法の検討

Study of a method for oil in water analysis with Excitation-Emission-Matrix and Parallel Factor Analysis

小島 礼慈

Reiji KOJIMA

川口 佳彦

Yoshihiko KAWAGUCHI

水中に残留する油分の分析は水質管理や排水規制の観点から非常に重要である。特に近年では水道原水や油田随伴水処理水中の油分混入監視など、現場での油分分析のニーズは増加している。水中の油分を測定する際、一般的には溶媒抽出法やクロマトグラフ法が用いられているが、現場での迅速分析は難しい。本稿では水中に残留する油分を無試薬で簡便に測定する手法を開発することを目的として、蛍光分析法を用いた分析法を評価した。また、塩分によるクエンチング影響の蛍光強度補正式を作成するとともに、PARAFAC解析を用いてEEM中に含まれる蛍光成分の分離を行い、得られた油分由来の蛍光強度より油分濃度の測定を行った。

Oil in water analysis is important for control of water quality and effluent regulation. Such as raw water and oil field produced water of oil contamination monitoring, the needs of oil analysis in the field has increased. When measuring oil in water, generally use liquid-extraction and chromatograph methods. But it's difficult to rapid and on site analysis. In this study, we evaluated use fluorescence analysis, which is a technique that does not need a simple reagent, for the purpose of developing a method of residual oil concentration in water. In addition, to creating a fluorescence intensity correction formula of the quenching effect of salinity, it performs separation of the fluorescent component contained in EEM using PARAFAC analysis was measured oil concentration than the fluorescence intensity derived from the oil.

はじめに

限られた水資源の利用のため、水質管理及び水質測定は非常に重要である。近年の水質汚染の原因の一つとして、油分による汚染が挙げられる。油分による水の汚染は水道原水や石油採掘時の随伴水処理水、海洋での原油流出事故^[1]など、様々な場所で起こっている。水道原水に限れば水質汚染として最も多いのは油類であり、水質事故の64.2%にも達する^[2]。石油随伴水には高濃度で油分が含まれており^[3]、排水管理の点からも油分濃度の測定は特に重要である。そのため、処理水の水質確保のため正確な油分濃度を知り、処理を最適化させる必要がある。

現在の油分分析法は環境省の油汚染対策ガイドライン^[4]に記載されているガスクロマトグラフィー/水素炎イオン化型検出器(Gas Chromatography/Flame Ionization Detector, GC/FID)が知られているほか、JIS規格ではn-ヘキサン抽出法が規定されている^[5]。n-ヘキサン抽出法は試料にn-ヘキサンを添加して油分を抽出し、その後ヘキサンを蒸発させ、残留物の重量を測定する手法である。抽出方

法にもよるが、定量範囲は5 mg~500 mg程度、繰り返し精度は10~20%と精度は高くない。アメリカ環境保護庁(United States Environmental Protection Agency, USEPA)は揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds, VOC)や多環芳香族炭化水素(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)など測定対象別にGC/FIDやガスクロマトグラフィー/質量分析計(Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS)などの手法を各種規定している^[6-8]。しかし、抽出率は使用する抽出溶媒、測定対象の油種それぞれに影響を受ける^[9]。混入監視のために水面の油膜を検知する機器も販売されているが、この手法は水面の油膜を検知する手法であり、水中に残留する油分は測定できない。また、水中に残留する油分は組成・性状も様々であり、水への残留度も不明であることが多い。そのため、水中に残留している油分の正確な濃度を知ることは困難である。これらの理由により、現在の油分分析は測定操作が煩雑であり、現場での迅速分析が困難となっている。

一般的な油分は有機化合物、特に炭化水素から構成されて

いる。炭化水素はパラフィン系、オレフィン系などが存在する^[10]が、蛍光を発する構造を多く含むため、蛍光分光光度計で測定が可能である。しかし、蛍光測定は原理上、吸光成分が多い試料では測定セル内において内部吸収効果 (Inner Filter Effect, IFE) が起こり、正確な蛍光を測定できない^[11]。また、蛍光測定はハロゲン系のイオンが存在すると蛍光強度が減少するクエンチングが起こることが知られている^[12]。これら現象に加え、環境水中には多くの蛍光性物質が含まれている^[13]。そのため、それぞれの蛍光スペクトルが重なりあい、正確な蛍光を測定することが難しい。本稿ではこれらの課題を解決するため、内部吸収補正のできる蛍光分光光度計を使用し、予め溶媒抽出法で油分濃度を定量した試料の3次元励起蛍光測定 (Excitation Emission Matrix, EEM) を行った後、PARAFAC解析を適用して蛍光成分を分離し、油分由来の蛍光強度を抽出して油分濃度との相関を評価した。また、蛍光消光を引き起こすイオン種と人口海水を用いて蛍光消光定数の算出を行い、正確な蛍光強度の評価を行った。

3次元励起蛍光測定 (EEM)

蛍光分析法は試料に対して特定の励起波長を当てて物質のエネルギー状態を励起する。その後、基底状態に戻る際に発せられる蛍光を検出する手法である^[14]。このとき発せられる蛍光の波長は物質固有であり、試料中の蛍光性物質の定性・定量に利用することが可能である。また、実験操作が簡便でありながら、比較的感度が高いという利点もある。特に、EEMは励起波長と蛍光波長をそれぞれ任意の範囲で測定する手法であり、全有機炭素 (Total Organic Carbon, TOC) や化学的酸素要求量 (Chemical Oxide Demand, COD) では得られなかった有機物の性状に関する情報を得られるため、広く利用されている。

PARAFAC解析

PARAFAC解析は多変量解析法のひとつであり^[15]、EEMのデータ解析には非常に有効である。近年、PARAFAC解析は環境水の分析では広く用いられている^[16, 17]。EEMは励起波長、蛍光波長を任意に設定でき、得られる情報量が多いことがその特徴である。しかし、蛍光スペクトルが重なりあった場合、その正確なピーク位置と強度を得ることは難しい。腐植物質に代表される蛍光性溶存有機物 (Chromophoric Dissolved Organic Matter, CDOM) では特にその傾向が顕著であり、得られた情報を最大限に活用できていない。PARAFAC解析は得られた複数のEEMに対して交互最小二乗法 (Alternative Least Squares Algorithm, ALS) などの統計的手法を適用し、重なり合った蛍光スペクトルをそれぞれ個別のスペクトルに分離する手法である。分離されたスペクトルは成分スペクトルとして個々に扱うことが可能となる。そのため、正確な蛍光強

度とピーク位置、蛍光成分の挙動など、EEMのみでは得られなかった情報を得ることができる。以下にPARAFAC解析で得られる結果とその評価指標について述べる。

Loading

PARAFAC解析の結果はそれぞれのデータからLoading (負荷量) として得られ、各変数に対する重みを表している。Loadingはそれぞれ励起波長、蛍光波長、試料に対して得られるため、EEMから分離された各蛍光スペクトルについて評価することが可能となる。

Core Consistency

Core ConsistencyはTucker3モデルに基づいた解析結果の評価指標の一つである。Core Consistencyを用いることで解析の際に設定した成分数が妥当な数であるか判断することができる。成分数が妥当であれば、Core Consistencyは100付近を示す。この数値が低い場合 (0以下もあり得る) は解析の結果に合理性がないと判断される^[18]。低い値となる例として、PARAFAC解析を行う際に設定した変数 (ここでは、EEMに含まれている可能性のある成分数) が実際に試料に含まれている成分数よりも多い数であったとき、ノイズ成分を実際に試料に含まれている成分と判断して算出してしまうときなどが挙げられる。

Split Half Analysis

Split half Analysisはデータセット (EEMの集合) を複数個に分割し、それぞれのデータセット単体で再度PARAFAC解析を行い、その後、それぞれから得られた成分スペクトルの一致率を判定する。Split-Half-Analysisはデータが統計的に一意であることを評価する指標である。データ数が少ない場合や設定した成分スペクトル数が妥当でない場合の一致率は低くなる^[11]。

残留油分の蛍光特性評価モデルの作成

油分の蛍光特性と濃度と蛍光強度の関係を評価するために、超純水中にB重油 (ナカライテスク製) を添加してEEM測定を行った。試料は、まずB重油を目標濃度となるように添加した超純水を、ホモジナイザ (T25 digital IKA製) を用いて6000 rpmで5分間攪拌して油分を分散させ、攪拌後に全量を分液ロートに移して10分間静置した。次に、分液ロート下方から抜き取り得られたものを含油試料とした。得られた試料は蛍光分光光度計 (Aqualog 堀場製作所製)^[19] および、油分濃度計 (OCMA-505 堀場製作所製) を用いて測定した。OCMA-505は溶媒抽出-NDIR法を採用しており、抽出溶媒はH-997 (ジクロロペンタフルオロプロパン) を使用した^[20]。得られた結果から蛍光強度と油分濃度の関係を評価した。蛍光分析は励起波長 (Excitation, Ex) : 220 ~ 600 nm, 蛍光波長 (Emission, Em) : 220 ~ 600 nm, Integration time 0.1 secの条件で測定を行った。得られた

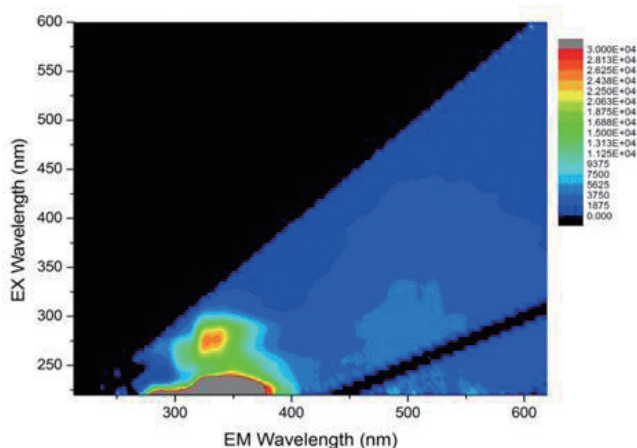


Figure 1 EEM of B heavy oil in pure water

EEMはIFEの補正および、散乱光のマスキングを行った。ブランク水は純水を用いた。

Figure 1に純水中にB重油を添加したEEMを記載する。複数のピークが確認され、それぞれのピーク位置はEx/Em = 275/320付近, Ex/Em = 225/350 nm付近, Ex/Em = 275/500付近の3種類が確認された。なお、短波長域では試料の吸光度が高くなる場合が多く、IFEの影響を完全に除去できなくなる可能性があるため、Ex/Em = 225/350 nmは使用しなかった。さらにEx/Em = 275/500は蛍光強度が低くブロードであったため使用しなかった。

Figure 2に、Ex/Em = 275/320付近のピーク位置で蛍光強度と油分濃度の相関を取得した結果を示す。なお、近似曲線の切片が0以上の値となっているが、これは溶媒抽出法による濃度測定値を過小評価したことによる。溶媒抽出-NDIR法では試料を正確に分取する必要がある。しかし、試料を分取する際に油分が分取容器内に吸着してしまうことを確認しており、その吸着量は約10 mg/L・OCBであった。Figure 2で得られた近似曲線より推定される吸着量も同程度であった。

EEM中で油分の蛍光スペクトルと重なり、水中残留油分含量に影響を与えられと考えられるタンパク質(チロシン, トリプトファン, フェニルアラニン)の濃度をそれぞれ変化させた溶液を作成した。この溶液を用いて、前述の試験方法で含油試料を作成し、油分濃度を測定した。クエンチン

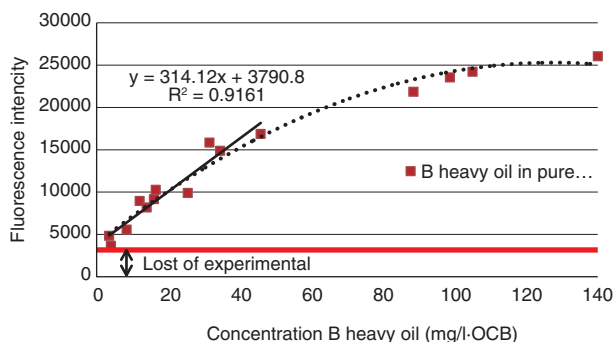


Figure 2 Standard curve

グ影響を補正する消光定数 K_q は人口海水を用いて同様の実験を行い、消光定数の算出を行った。ここで消光定数 K_q は消光後の蛍光強度に対する消光前の蛍光強度比として算出した。

人口海水を用いた消光実験の結果をFigure 3に記載する。溶媒抽出-NDIR法で測定した油分濃度が一定のでも、人口海水の濃度を上昇させることで、蛍光強度が見かけ上減少することが分かった。また、別途塩化カリウムや塩化マグネシウムを使った消光実験を行い、同様に消光現象が起ることを確認した。人口海水を使用した場合の結果から得られた消光定数 K_q は1.5となった。

得られたEEMはPARAFAC解析でモデルを作成し、成分を分離した。解析にはSolo + MIA (ver. 7.9 Eigenvector製)を使用した。PARAFAC解析には161検体の試料を用いた。解析はEx: 250~600, Em: 250~600の範囲で行った。その後、分離された油分由来の成分スペクトルの蛍光強度から、試料中の油分濃度を算出した。Figure 4にPARAFAC解析によって分離された成分スペクトルを記載する。解析の結果、EEMは3成分に分離された。Core Consistencyは99, Split half Analysisは89.3%であった。成分スペクトル1は油分濃度と相関を取得するのに使用したピーク位置の蛍光成分が含まれているため、油分蛍光の主成分スペクトルとした。成分スペクトル2, 3はその他成分とした。作成したモデルは2つの評価指標から十分な精度を持っていると考えられる。

残留油分モデルへの実環境水測定結果の適用

前述で作成した残留油分モデルを実環境水に適用するため、実環境水を7地点(海水3地点, 陸水4地点)採取し、測定を行った。試料は採取後、氷冷状態で輸送した。また、懸濁態を取り除くため、すべての試料は孔径0.45 μm のフィルタ(ナイロンメンブレン, Millipore製)でろ過を行った。各試料のEEM測定結果からはタンパク質系やフミン質系などの蛍光ピークが確認された。しかし、蛍光分析法, 溶媒抽出-NDIR法による油分濃度測定ではすべての試料で油分は検出されなかった。そのため、前述のモデル作成に用いたB重油を前述と同じ手法で添加し、各測定を行った。測定

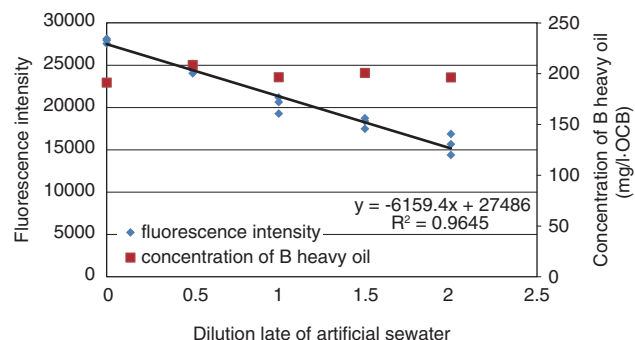


Figure 3 Test result of fluorescence quenching using artificial seawater

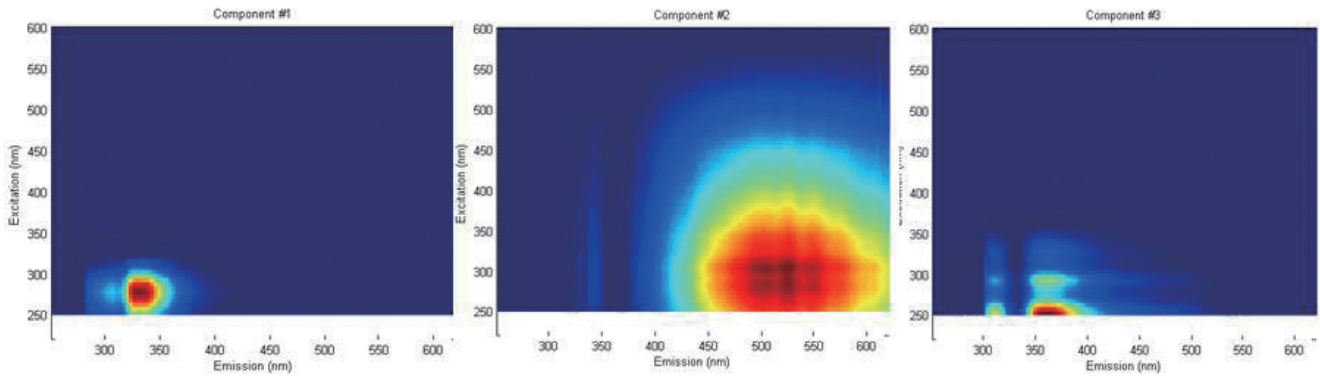


Figure 4 Three components determined by PARAFAC

後、残留油分モデルを使用して夾雑影響を除去した。また、海水試料の3地点は消光定数を用いてクエンチング影響の補正を行った。Figure 5にその結果を示す。前述の残留油分モデル作成に使用した蛍光強度と溶媒抽出-NDIRの相関の検量線とほぼ同様の強度を得ることができた。実環境水には油分のピークと重なるタンパク質系のピークが存在していたが、PARAFAC解析を適用することでその影響を除去することができた。また、海水試料では消光定数 K_q を使用してクエンチングの補正を行ったことで、良好な結果を得ることができた。一部の試料では検量線よりも蛍光強度が低くなる現象が見られたが、その一つの要因として環境水中に蛍光を消光させる成分が含まれていることが考えられる。ごく微量であるが、環境水中にも臭化物イオンが存在することが報告されており^[21]、今回評価していない成分によるクエンチング影響が考えられる。

おわりに

本稿では、水中の残留油分を測定する手法の一つとしてEEM-PARAFAC法を適用した。その結果、試料に含まれるB重油由来の油分を定量できることが示された。特に、PARAFAC解析を用いたことで他の蛍光成分の夾雑影響を除去できることが分かった。また、実環境水から油分は検出されなかったが、B重油を添加した試験では、実環境水中油分も純水中油分と同様に検出することができた。実環境水は陸水と海水の2種類を使用した^が、海水に対するク

エンチング補正は良好であり、海洋での油分測定も可能であることが示された。油分による汚染は様々な場所で突発的に起こる可能性があり、一度汚染されるとその処理には膨大なコストと手間がかかる。水資源は限りあるものであり、水質保全・水質管理の観点からも水中の油分分析は重要な項目である^と考える。本分析手法が利用され、より良い水質が確保されることを期待する。

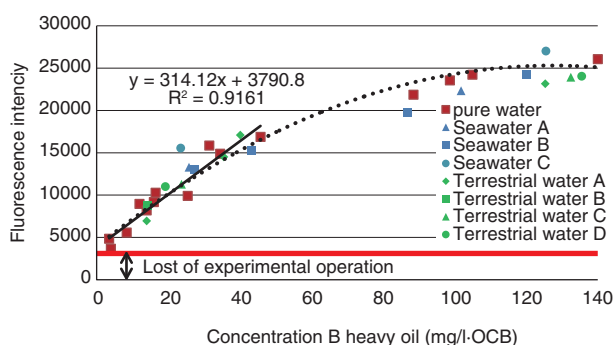


Figure 5 Result of fluorescence intensity applied PARAFAC model and quenching correction

参考文献

- [1] Peter Burgherr, "In-depth analysis of accidental oil spills from tankers in the context of global spill trends from all sources", *J. Hazardous Materials*, **140**, 245(2007)
- [2] 厚生労働省(2014) 全国水道担当国会議資料13-4
- [3] 田崎ら, "オマーン国における異なる3種の石油随伴水のパイロットプラント処理試験", *J. Jpn. Petrol. Inst.*, **56**, No.6(2013)
- [4] 中央環境審議会土壌農薬部会土壌汚染技術基準等専門委員会, 油汚染対策ガイドライン(2006)
- [5] 日本工業規格(JIS) K0102(工場排水試験法), p921-927(2015)
- [6] U.S. Environmental Protection Agency, Methods 8015D, Nonhalogenated organics using GC/FID. Revision 4(2003)
- [7] U.S. Environmental Protection Agency, Methods 8260B, Volatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS). Revision 2(1996)
- [8] U.S. Environmental Protection Agency, Methods 8310, Polynuclear aromatic hydrocarbons. Revision 0(1986)
- [9] 藤原ら, "環境中超微量有害化学物質の分析, 検索技術の開発に関する研究—油分析に影響する各種要因について—", 岡山県環境保健センター年報, **32**, 67-74(2008)
- [10] 柴田康行, "石油成分の分析について", *環境科学*, **7**, No.3, 577(1997)
- [11] Tsutomu Ohno, "Fluorescence inner filtering correction for determining the humification index of dissolved organic matter", *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 742(2002)
- [12] Joseph R. Lakowcz, "Principles of fluorescence spectroscopy", Third Edition. Springer(2006)
- [13] 小松ら, "三次元励起蛍光スペクトル法による霞ヶ浦湖水及び流域水中DOMの特性評価", *水環境学会誌*, **31**, 261(2008)
- [14] 木下一彦ら, "蛍光測定 生物科学への応用", 学会出版センター(1983)
- [15] Rasmus Bro, "PARAFAC", Tutorial and applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **38**, 149-171(1997)
- [16] K. R. Murphy et al., "Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques", PARAFAC. *Analytical Methods*(1759-9660), **5**, **23**, 6557(2013)
- [17] C.A. Stedmon et al., "Tracing dissolved organic matter in aquatic environments using a new approach to fluorescence spectroscopy", *Marine Chemistry*, **82**, 239(2003)
- [18] Rasmus Bro et al., "A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models", *J. Chemometrics*, **17**, 274(2003)
- [19] Adam M. Gilmore, 濱上郁子, *Readout*, **41**,19(2013)
- [20] 西尾友志, 高坂亮太, *Readout*, **42**, 120(2014)
- [21] 越後ら, "琵琶湖・淀川水系における臭化物イオンの発生構造", 土木学会論文集G Vol.65 No.4 218-225(2009)



小島 礼慈

Reiji KOJIMA

株式会社 堀場アドバンスドテクノ
開発部



川口 佳彦

Yoshihiko KAWAGUCHI

株式会社 堀場アドバンスドテクノ
開発部